

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-357607
 (43)Date of publication of application : 13.12.2002

(51)Int.Cl. G01N 33/53
 C12M 1/00
 C12M 1/40
 G01N 37/00
 // G01N 31/22

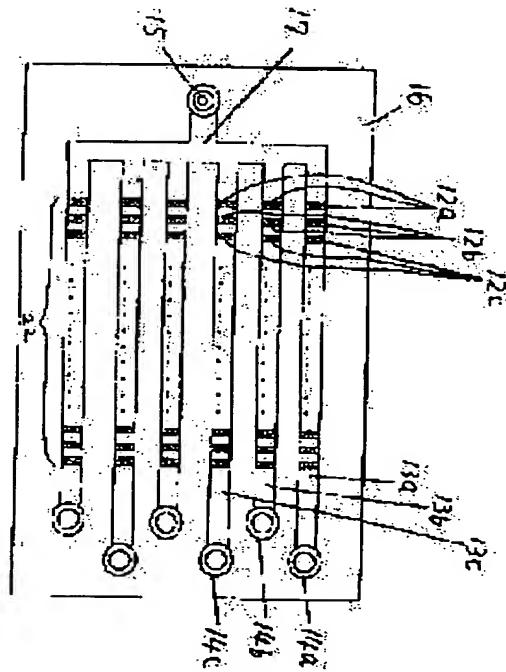
(21)Application number : 2002-079589 (71)Applicant : OLYMPUS OPTICAL CO LTD
 (22)Date of filing : 29.08.1997 (72)Inventor : SUYAMA AKIRA

(54) INTEGRATED REACTOR

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a reactor facilitating the handling of various types of liquid such as specimens and washings necessary for respective processing when measuring an object solid-phased for every solid phased region.

SOLUTION: This integrated reactor is provided with the solid phased region group having multiple solid phased regions disposed in series and extending and the solid phased object for biological reaction solid-phased for every solid phased region and is characterized in that the solid phased region group is formed by disposing the multiple solid phased regions disposed in series, in parallel to each other or integrating them into a bundle.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 27.08.2004

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's

decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(51) Int. Cl.	識別記号	F I	マークコード (参考)
G01N 33/53		G01N 33/53	M 2G042
C12M 1/00		C12M 1/00	A 4B029
1/40		1/40	B
G01N 37/00	102	G01N 37/00	102
// G01N 31/22	121	31/22	121 P
審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全9頁)			

(21) 出願番号 特願2002-79589 (P 2002-79589)
 (62) 分割の表示 特願平9-234145の分割
 (22) 出願日 平成9年8月29日 (1997. 8. 29)

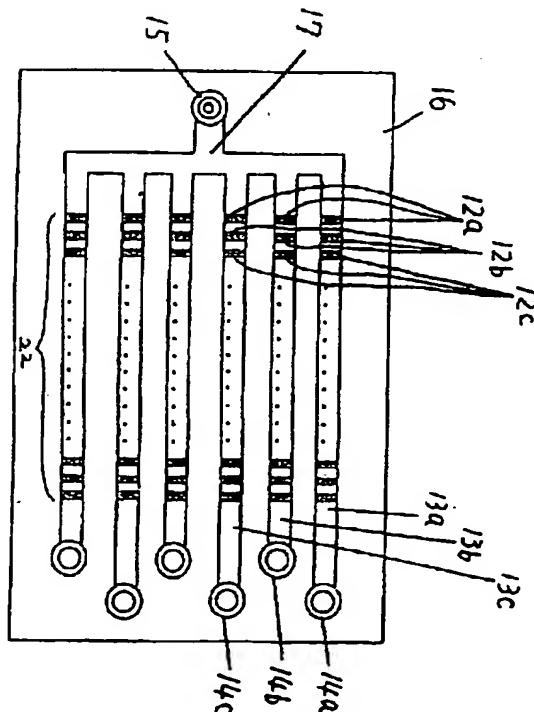
(71) 出願人 000000376
 オリンパス光学工業株式会社
 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号
 (72) 発明者 陶山 明
 東京都八王子市下柚木3丁目2番6-501
 (74) 代理人 100058479
 弁理士 鈴江 武彦 (外4名)
 F ターム (参考) 2G042 AA01 BD19 CB03 DA09 EA13
 FA20 FB02 FB06 GA01 HA02
 HA03
 4B029 AA07 BB20 CC03 FA02

(54) 【発明の名称】集積化反応装置

(57) 【要約】

【課題】 本発明の課題は、固相化領域毎に固相化された固相化対象を用いた測定を行う際に、必要な各処理用の流体、例えば試料や洗浄液のような各種液体の取り扱いが簡単である反応装置を提供する。

【解決手段】 複数の固相化領域が直列配置されて延在する固相化領域群と、前記固相化領域毎に固相化された生物学的反応のための固相化対象と、を具備し、前記固相化領域群を前記直列配置された領域について互いに平行になるように複数並列されるか束状に集積化されることを特徴とする集積化反応装置。



【特許請求の範囲】

【請求項1】複数の固相化領域が直列配置されて延在する固相化領域群と、前記固相化領域毎に固相化された生物学的反応のための固相化対象と、を具備し、前記固相化領域群を前記直列配置された領域について互いに平行になるように複数並列されるか束状に集積化されていることを特徴とする集積化反応装置。

【請求項2】(1) 複数の固相化領域が直列配置されて延在する固相化領域群であり、且つ前記固相化領域群が前記直列配置された領域について互いに平行になるように複数並列されるか束状に集積化されていることを特徴とする固相化領域群に固相化される生物学的反応のための固相化対象と試料とを反応させる工程と、

(2) 複数の固相化領域群に亘って直列する固相化領域毎に生じた測定対象による反応パターンを測定する工程と、を具備するを使用する生物学的測定対象の検出方法。

【請求項3】前記固相化領域群が、一体に配置されていることを特徴とする請求項1に記載の集積化反応装置。

【請求項4】前記複数個の固相化領域群の全てが、1本に連結されていることを特徴とする請求項1または3の何れか1項に記載の集積化反応装置。

【請求項5】前記複数の固相化領域群の全てを1本に連結して、一方方向に沿った反応または測定を行うことを特徴とする請求項2に記載の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、生物学的反応のための固相化対象、例えば、複数のDNAプローブを用いてそのDNAプローブと相補的に反応するターゲットDNAやmRNAを検出するためのデバイスに関する。

【0002】

【従来の技術】近年、ヒトゲノム計画と言われるようなプロジェクトが世界的な規模で進められており、人間の全遺伝子の塩基配列の解析が試みられている。この作業は非常に多くの人手を要し、かつ煩雑な作業にもかかわらず、21世紀の初頭には解明が終了すると言われている。この塩基配列の解析(シーケンシング)は先に述べたように非常に煩雑なため、解析機器の改良、自動化やDNAチップと呼ばれる新規な解析方法の提案がなされている。DNAチップとはシリコン等の基板に半導体のリソグラフィ技術を用いて多数の種類のDNAプローブが決められた位置に配置されたものである。また、DNAプローブとはDNAを構成する4種の塩基アデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、チミン(T)が相補的に結合する性質を利用したもので、例えば塩基Aと塩基T、塩基Gと塩基Cがそれぞれ相補的に結合する。従って、AGCTT(5'→3')という塩

基配列のプローブを用いるとAAGCTという塩基配列のDNAを選択的に捕らえることができる。

【0003】例えばDNAプローブの固相化方法としては、Science 251: 767-773(1991年2月発行)に示されているように、光反応を用いて実質的に平坦な基板上にDNAプローブを構成する方法がある。この方法を示す。シラン処理によりアミノ基を基板表面に形成し、光保護分子Xを結合させた表面の一部に紫外線を照射し、目的の位置の保護基をはずしてアミノ基を露出させる(a)。次いで露出したアミノ基と光保護基の付いた4種のDNA塩基のうちの1種の塩基Aを選択し、反応させる(b)。その結果、光保護基Xの付いたDNA塩基Aと光保護基のみが付いた表面が形成される(c)。さらに、保護基のみが付いた表面の一部を選択し、その部分に光を照射して光保護基の付いたDNA塩基Bと反応させる(d)。その結果、光保護基の付いたDNA塩基Aと光保護基の付いたDNA塩基Bを含む表面が形成される(e)。これらの反応を2次元的な位置決めでDNA塩基Cと塩基Dについても同様に行

うと4種の塩基全てを基板表面に固定することが出来る。さらに、任意の塩基と光保護基とが付いた部分に対して上述したプロセスを繰り返すことにより、3次元的に塩基の積み重ねが行われて(f)に示すように異なった塩基配列を有するDNAプローブを特定の場所に特定の配列で形成することができる。従って、本技術を用いることにより例えば8種類の塩基から成るあらゆる塩基配列の組み合わせのDNAプローブを基板上に構成する場合、32枚のマスクを用意してリソグラフィと光反応技術を32回繰り返せば全ての組み合わせのDNAプローブを基板上に構成することができる。このように形成された基板はDNAチップと呼ばれ主に未知の塩基配列のDNAのシーケンシングに用いる事が出来、従来の電気泳動を利用したシーケンシング技術に比べ、高速で簡便にシーケンシングできるという利点がある。

【0004】また、国際出願特許公開WO93/09668号(特表平7-506561号)は、上記国際出願に記載されたシーケンシング技術の応用に関するものであり、複数のフロー式チャネルに適用する方法が述べられている。予めシラン処理によりアミノ基を基板表面に形成した実質的に平坦な基板に対して複数のフロー式チャネルを取り付けた後に、それぞれのチャネルの全長に亘って一種類の、しかしチャネル毎には異種の塩基配列からなるDNAプローブが固定化される。また、本技術の好ましい態様では、即ち、アミノ基を有する基板を複数の平行に並んだチャネルブロックと接続させた後に、選択されたDNAプローブを含む処理液を特定のチャネルに流すことにより、目的のDNAプローブの1つ目の塩基を固相化し、次に、基板とチャネルブロックとを互いに所定角度(例えば90度)相対的に回転させてから再び基板とチャネルブロックとを接続させた後に、2つ

の塩基を固相化し、次に、基板とチャネルブロックとを互いに所定角度(例えば90度)相対的に回転させてから再び基板とチャネルブロックとを接続させた後に、2つ

目の塩基に相当する塩基を固相化する工程を順次繰り返すことにより、所望の塩基配列からなるDNAプローブを構成する方法が述べられている。この方法は光反応による方法と組み合わせることもでき、先に述べたDNAチップを一度に大量に製作することが出来るという利点がある。

【 0 0 0 5 】

【発明が解決しようとする課題】従来技術は、DNA配列のシーケンシングを行うという目的では有力な方法と考えられるが、最近ではポストゲノムの観点から、得られたDNA情報を如何に利用するかということが今後の課題である。例えば、DNAがどのように発現するかを研究するために細胞内で発現するmRNAのパターンを解析することが行われるようになってきている。同じ遺伝子を持ちながら臓器の違いによるmRNA発現の違いや同一の細胞でも時間的な発現の変化を研究することは遺伝子治療、医薬品開発、農業・畜産など多くの分野に応用する事が出来、今後の発展が期待されている。そのような発現パターンを調べるにはmRNA、またはmRNAから転換したcDNAに対応する複数のDNAプローブを準備し、目的の細胞に含まれるmRNA、またはmRNAから転換したcDNAとDNAプローブを反応させる方法が考えられる。このような測定においては測定対象のmRNA、またはmRNAから転換したcDNAの塩基配列はある程度既知のものであり、また測定の正確さ、効率性を考慮すると20～60塩基程度、好ましくは40塩基付近の長さのDNAプローブが用いられる。先に述べたDNAチップでこのようなプローブを構成するには80～240枚のマスクを準備してリソグラフィと光反応による塩基の合成を80～240回繰り返す必要がある。従って、DNAプローブの長さが長くなるにつれ多大な労力が必要になるという問題がある。さらに、合成の収率を考慮すると、長さが40塩基に揃ったDNAプローブを基板上に直接合成することは実用上不可能といえるが、長さが揃っていないと測定が不正確になってしまうので好ましくない。

【 0 0 0 6 】また、一つの細胞では約10万個の遺伝子のうち2～3万種のmRNAが発現していると考えられるが、それらのうち細胞特異的なものの割合は、数%（1～3%程）程度であると推測されている。従って、測定対象のmRNA、またはmRNAから転換したcDNAの種類は数百～千程度と考えられる。先に述べたDNAチップで8塩基の長さのプローブは4⁸すなわち65,536種類形成できるが、測定対象のmRNA、またはmRNAから転換したcDNAの種類は最大で2～3万程度、実際にはその1/10以下と想定されるのでこのように大量種類のプローブを形成する必要はない。DNAプローブと測定対象のmRNA或いはcDNAの断片とのハイブリダイゼーションの熱安定性は一様ではない。また、測定装置のダイナミックレンジを考慮する

と、処理濃度が大きく異なるmRNA或いはcDNA断片を同時に処理することは不可能である。したがって、同一測定条件の下にある大量種類のDNAプローブの中で、有効な結果を与えるものは限られる。このことからも、大量種類のDNAプローブを基板上に形成する必要が無いことが分かる。

【 0 0 0 7 】さらに、先に述べたDNAチップでは光反応による合成を繰り返すため、光照射時のDNAプローブの紫外線による劣化が問題となる可能性もあり20塩

10 基以上の長さのプローブを形成する方法としては適切ではない。また、DNAチップは実質的に平坦な基板上に形成されるが、固相化時には多数の試薬を交互に反応させたり、また測定時には試料との反応や洗浄を行うために液体を何度も作用させる必要がある。平坦な基板のDNAチップを用いて上記の処理を行うには反応液の入った容器にDNAチップを浸漬するか、DNAチップ表面を有して流路を形成するような治具を製作して液体処理をする必要がある。従って、これらの処理を円滑に行うためにはDNAチップ以外に液体処理をするための治具を必要とする。しかし、浸漬する方法では、固相化および試料の測定に当って余剰量の各種処理液を必要とする。また、流路を適用する方法では、DNAプローブが固相化された面積が制限されてしまう。

【 0 0 0 8 】従って、本発明の目的は、固相化領域毎に固相化された固相化対象を用いた測定を行う際に、必要な各処理用の流体、例えば試料や洗浄液のような各種液体の取り扱いが簡単である反応装置を提供することである。

【 0 0 0 9 】また、本発明の更なる目的は、複数の固相化領域群に亘り、直列する複数の固相化領域に固相化される固相化対象について効率よく検出することが可能な反応装置を提供することである。

【 0 0 1 0 】

【課題を解決するための手段】上記課題を解決するための本発明は、複数の固相化領域が直列配置されて延在する固相化領域群と、前記固相化領域毎に固相化された生物学的反応のための固相化対象と、を具備し、前記固相化領域群を前記直列配置された領域について互いに平行になるように複数並列されるか束状に集積化されていることを特徴とする集積化反応装置；並びに（1）複数の固相化領域が直列配置されて延在する固相化領域群であり、且つ前記固相化領域群が前記直列配置された領域について互いに平行になるように複数並列されるか束状に集積化されていることを特徴とする固相化領域群に固相化される生物学的反応のための固相化対象と試料とを反応させる工程と、（2）複数の固相化領域群に亘って直列する固相化領域毎に生じた測定対象による反応パターンを測定する工程と、を具備するを使用する生物学的測定対象の検出方法である。

【 0 0 1 1 】また、光透過性の流路の内壁に複数のDN

Aプローブが各々独立して配置されていることを特徴とするDNAキャピラリイである。ここで、前記流路の末端部が、開放された中空状のキャピラリイであることが好ましい。また、前記流路は、筒形状のキャピラリイであることが一層好ましい。前記流路が、複数個で且つ一体に配置されれば、処理能力が向上する。特に、複数個の流路の全てが、少なくとも一つの末端部付近で合流路と連通していれば、DNAプローブの固定化処理や該DNAプローブによる試料の測定等に際して、合流路を通じて各種処理用液体が一括して導入されるか或いは回収される。

【0012】また、複数のDNAプローブが、前記流路に沿って直列した配置である場合には、流路に沿って処理用の液体（場合によっては、乾燥その他の目的のための気体）を流路に沿って流すことにより、それぞれのDNAプローブが次々に処理される。

【0013】また、前記流路が、ガラスまたはシリコン基板上にエッチング加工されて形成されれば、DNAプローブの固定が容易になる。しかも、好ましい態様においては、DNAプローブが光反応を用いて固定されることで、本発明のDNAキャピラリイを好適に製造することができる。

【0014】

【発明の実施の形態】に本発明のDNAキャピラリイの第一の実施の形態を示す。この発明の実施の形態は次のように構成されている。は、種々のDNAプローブ1a, 1b, 1c…が、注入用開口部2aおよび排出用開口部2bを両端に有する光透過性の円筒状キャピラリイ4の内壁5に縞状に固定されている状態を示している。キャピラリイのサイズは内径が0.1mmから数mmまで種々のサイズが用いられるが、取り扱いの容易さから0.5mmから1mm程度のものが好適である。キャピラリイ4の内径や流路長は、測定する試料の容量や液体の流動し易さに応じて決定される。

【0015】キャピラリイ4の内部に固定するDNAプローブは、予め所望の塩基配列からなる20塩基以上、好ましくは20～60塩基、特に40塩基付近（例えば、35～45塩基）のものであって、その種類は目的によって異なり、測定対象となるmRNA、またはmRNAから転換したcDNAの数に依存するが、1種類から数千種類までを対象とする。本発明の第一の目的であるmRNAの発現パターンを解析するためには数千種類のDNAプローブを固定する必要があるが、例えば感染症などの検査を目的とする場合には1から数種類のDNAプローブで十分である。各DNAプローブ1a, 1b, 1c…の間隔は、測定対象の数が多い場合には密にすればよい。測定対象の数が少ない場合にはその間隔を広く取ることができ、そうすることにより測定し易さが増す。実際には、20～60塩基程度のDNAプローブを複数種類直列的に配置するために、1μmから数mm

程度まで種々の間隔で各DNAプローブ1a, 1b, 1c…を配置することができる。必要ならば、同種のDNAプローブを複数固定化したり、対照用のタンパクを固定化することにより、測定の多様性を加えてもよい。

【0016】通常、DNAキャピラリイを用いた測定は、測定対象が微量である場合を考慮して、蛍光や化学発光を利用した光増感方式を採用するのが好ましい。キャピラリイ4に固定化された各DNAプローブ1a, 1b, 1c…の間隔が密であるとき、蛍光顕微鏡等のように高い分解能を有する測定手段を用いて複数の反応パターンを個別に読み取る必要があるが、数mmの粗い間隔であればトランスイルミネータを用いることにより、肉眼でも観察が可能である。このような光測定をし易くするためには、光透過性のよい任意の部材（プラスチック類、シリカ、ガラス、ポリマー等）からなるDNAキャピラリイを使用するべきであり、特に後述するシラン処理による製造方法を行うにはガラス或いはシリコンが好適である。必要ならば、部分的に光反射性または遮光性であってもよい。市販のガラスキャピラリイを利用すると安価にDNAキャピラリイを製作することができる。

【0017】次にDNAキャピラリイの製作方法について説明する。は、種々のDNAプローブ1a, 1b, 1c…をガラスキャピラリイの内壁5に固定化する方法を示している。以下に示す各製造プロセスにおける各種処理用液体の導入は、キャピラリイ4の注入用開口部2aから適宜の分注手段によって行なわれ、処理後の液体の排出は、排出用開口部2bから適宜の吸引手段によって行なわれる。まず、内壁5をシランカップリング剤を含む溶液をキャピラリイ4中に導入して、アミノ基(NH₂)₆をその表面に形成する(S1)。次に、特定の波長の光、好ましくは紫外線で光分解を起こすキャップリング剤7を含む溶液をキャピラリイ4中に導入して、内壁5全体をアミノ基で覆う(S2)。次に、内壁5の固定化したい領域に紫外線照射して、その領域のみのアミノ基6を露出させる(S3)。ここで、特定の場所のみに紫外線8を照射するためには、半導体のリソグラフィ技術で用いられているマスク部材で特定の場所以外に光が当たらないようにするか、光をレンズ等で照射範囲を絞り込めばよい。また、キャピラリイ4が円筒形状であるから、キャピラリイ側面をほぼ直角に入射する角度であれば、任意の方向から光照射して構わない。また、キャピラリイ4全体が光透過性であるために、キャピラリイ4の内壁5は、紫外線照射された領域のみがリング状に脱保護された状態になる。

【0018】次に、アミノ基と反応して結合する結合性部分を分子の一端に、アミノ基もしくはチオール基と反応して結合する結合性部分を分子の他端に有するリンカーモル子9を含む液体をキャピラリイ4中に導入する(S4)。このとき、リンカーモル子9の一端の結合性部分のみが内壁5上のアミノ基6と結合し、他端の結合性部分

はフリーの状態となる。次に、末端部にアミノ基或いはチオール基を形成させたDNAプローブ10を含む液体をキャピラリィ4中に導入して、リンカー分子9にDNAプローブ10を結合させる(S5)。なお、適宜の洗浄液を適量導入してキャピラリィ4内を洗浄するプロセスを介して、上記(S3)、(S4)、(S5)の固定化プロセスを所要の間隔だけ離間させた別の場所に変えて繰り返すことにより、に示すような目的の場所に目的のDNAプローブ1a, 1b, 1c…を各々リング状に独立して固相化したDNAキャピラリィを製作することができる。ここで、本発明においてリング状または環状とは、中空状流路の断面形状に応じて円形、多角形、楕円形等の種々の形を含んでいる。また、流路とは、少なくとも所要量の処理用液体が流れることのできる幅と高さを有している。この流路は、好ましくは毛管力による流動促進作用を有するように選ばれる。したがって、単に、凹凸の隆起が形成された表面は、流路とは呼ばない。

【0019】なお、(S1)で用いられるシランカップリング剤としては、例えばアミノエチルアミノピロピルトリメトキシシラン等が用いられるが、これに限定されるものではなくアミノ基を表面に形成できるようなものであれば、アミノエチルアミノピロピルメチルジメトキシシラン等のアミノシラン類が利用可能である。(S2)で用いられるキャッピング剤としては、4, 5-Dimethoxy-2-nitrobenzyl chloroformate、6-Nitroveratryl chloroformate、4-Nitrobenzyl chloroformate、o-Nitrobenzyl-p-nitrophynyl carbamate等が用いられるが、この限りでなく紫外線または可視光によりアミノ基との結合が外れるような分子内開裂を示す物質が用いられる。

【0020】(S3)で用いられる光は通常350nm前後の光が用いられるが、キャッピング剤や用いる溶媒の種類に依存して最適な光分解性が得られるような波長帯の光が選択される。また、紫外線のような特定光の照射のための光学装置は、市販のものでよい。

【0021】(S4)リンカー分子としては、Dissuccinimidyl suberate等のhomo bifunctional N-hydroxysuccinimidyl (NHS) estersグループ分子やDimethyl adipimidate-2-HCL等のhomobifunctional imidoestersグループ分子が用いられる。また、本実施の形態で用いたリンカー分子は分子の両末端にアミノ基と反応するスクシイミド基を有しているが、片方は例えばチオール基やカルボキシル基と反応するようなヘテロな反応基を有するリンカー分子を用いることも可能である。

【0022】(S5)で用いられるDNAプローブ10は、DNAプローブ合成時にDNAの5'末端にアミノ基或いはチオール基を付与したものが用いられる。アミノ基或いはチオール基の付与は、市販のDNAシンセサイザーの専用キットを用いて容易に得られる。DNAプローブに用いる塩基配列は、遺伝学的、生化学的または免疫学的、病理学的に有意義な任意の生物学的材料に関するものが選択される。

【0023】キャピラリィ4の内壁5に対する(S10)、(S2)、(S3)、(S4)および(S5)の各プロセスでの処理条件は、キャピラリィの材質、形状、サイズやDNAプローブの種類に応じて適宜設定すればよい。

【0024】製作したDNAキャピラリィを用いて測定を行うには、注入用開口部2aおよび排出用開口部2bを通じて、試料や試薬等の処理用液体の注入および排出を行えばよい。ここで、排出用開口部2bからの排出時機を種々変更することによって、所望の反応時間を得ることが可能となる。例えば、試料をキャピラリィ4の一端の開口から導入し、TM値から10~15度低い温度で反応させ、キャピラリィ洗浄のため洗浄液による洗浄操作を行った後、蛍光測定等に用いられる。ここで使用する洗浄液は、使用温度や組成を適宜変えることにより、ストリンジエンサーを調節したものが望ましい。試料の測定に関与するプロセスが、固定化したDNAに対するハイブリダイゼーション反応を含む場合には、試料中のDNAはハイブリダイゼーション可能な状態に調製された上で、DNAキャピラリィに適用される。試料は、生物学的材料がそれ自体液状であるか適宜の溶液に溶解または懸濁された液状のものをいう。従って、試料の種類は、任意である。

【0025】また、本実施の形態では1本のキャピラリィを用いて行った例を示したが、複数本並列させるか束状にして同時に処理することも可能である。複数のキャピラリィの配置は任意であるが、測定に関与する一部または全部のプロセスにとって都合の良い配置とするのが好ましい。

【0026】に本発明のDNAキャピラリィの第二の実施の形態を示す。これは複数のDNAキャピラリィを効率よく製作するに適した形態を示している。(a)は全体像、(b)は上面から見た図を示している。ガラス又はシリコン等の材料からなる下側基板16aおよび上側基板16bとを接着させた基板16には、下側基板16a上に図示するようなパターンの溝が設けられており、これによって複数のDNAキャピラリィ13a, 13b, 13c…が形成されている。(b)に示すように各々のDNAキャピラリィ13a, 13b, 13c…の一端は個別出入口14a, 14b, 14c…の真下まで延在して、各個別出入口14a, 14b, 14c…を通じて外気に開放されており、他端は合流路としての連結流

路17で一本に連結され、共通出入口15の真下まで延在して、この共通出入口15を通じて外気に開放されている。個別出入口14a, 14b, 14c…および共通出入口15は、例えばスクリーン印刷技術を利用して接着剤を所定の位置に薄膜状に形成して接着することにより取り付けることが出来る。DNAプローブ12a, 12b, 12c…は、図示するように各々のDNAキャピラリィ13a, 13b, 13c…の流路に沿って流体の流れる方向とは直角な方向に直線上に配置されている。

【0027】DNAプローブの固相化プロセスは、第一の実施の形態で述べた光反応を利用した方法が適用できる。第二の実施の形態においてはDNAプローブの固相化に用いる固相化用処理液は共通出入口15から連結流路17を介し、各々のDNAキャピラリィに同時に供給できるとともに、それら処理液の排出もまた共通出入口15を通じて一括して吸引排液が行なわれる。また、紫外線による露光プロセスは、適宜の紫外線照射手段を上方でXY方向に移動可能にし、DNAキャピラリィ13a, 13b, 13c…に対して直交するライン状にスキャニングしながら照射することにより、一度に全てのDNAキャピラリィ13a, 13b, 13c…の特定の場所にDNAプローブ12aを形成することができる。本実施形態では、下側基板16aが光透過性を有していないとも、上側基板16bが光透過性であれば、下側基板16aおよび上側基板16bの両壁面が露光されて、環状の固相化が達成される。

【0028】次に、ライン状に照射する位置をDNAキャピラリィ13a, 13b, 13c…平行に所定間隔分だけ移動し、同様のスキャニング照射を行った後にDNAプローブ12bによる固相化を行う。このような操作を繰り返すことにより、に示すように独立して配置したDNAプローブ12a, 12b, 12c…を形成することができる。なお、上述した露光プロセスにおいて、スキャニングの軌跡上で露光したくないDNAキャピラリィが有る場合には、例えば紫外線照射手段による照射の有無を適当なスイッチ回路により選択的に切り替えるようにして、スキャニングの際に紫外線が照射されないようにすることにより、各DNAキャピラリィ毎に多様なDNAプローブの組合せで固相化することができる。このことは、多項目の測定対象を測定する上で、必要最小限の項目での測定を可能とするとともに、余分なDNAの固相化を省くのに有効である。各DNAキャピラリィに同種のDNAプローブの組合せを固相化すれば、最大キャピラリィと同数の試料に関する測定を同時に実施できる。

【0029】上記の固相化プロセスにおいて、共通出入口15を通じてDNAキャピラリィ13a, 13b, 13c…に導入された固相化用処理液のうち、特に、DNAプローブを含む液体（のS5参照）及びそれに続く洗浄のための洗浄液については個別出入口14a, 14b,

b, 14c…から排出するようにすれば、異なった液を複数用いる際に起るコンタミネーションの影響も極力避けることが出来る。また、測定の際には個別出入口14a, 14b, 14c…から試料等を注入して測定を行うことにより、異なった試料間で各液とが完全に分離された状態で流動させることができるので、測定精度が向上する。

【0030】DNAキャピラリィのサイズは用途に合わせ種々の大きさに加工することができるが、実用的には幅が10μm～数mm、深さ1μm～500μm、長さが数mm～100mm、DNAキャピラリィ間隔10μm～数mm程度で十分である。但し、反応の効率性を考えると測定対象となるmRNA、またはmRNAから転換したcDNAの拡散速度は毎秒で数μと遅いのでDNAキャピラリィ断面形状は、幅を広くしても深さは浅くするような扁平構造をとることにより、反応時間の短縮、試料の微量量化、観察視野の増加等が期待できる。

【0031】DNAキャピラリィ13a, 13b, 13c…の溝部分の物理的な加工方法としては、エキシマレーザエッティング、フォトリソグラフィによるエッティング等様々な方法が考えられ、本発明においてはその加工方法を限定するものではないが、以下に、半導体加工技術を用いて溝加工する方法を例にして従って説明する。また、説明の都合上、aにおける下側基板16aと上側基板16bとを別々にしてシラン処理したときの場合を例にして説明する。まず、aのように、シリコンウエハー基板20に酸化膜19を5000Å程度形成し、さらにレジスト膜18を形成する。次に、bのように、シリコンウエハー基板20上の溝パターンに応じたマスクを

製作し、アライナーを用いてレジスト露光を行って現像する。次に、cのように、パターニングされたレジスト膜18を用いて、酸化膜19のエッティングを行う。エッティングにはフッ酸とフッ化アンモニウムを1:9程度に混合した溶液を用いる。次に、dのように、レジスト膜18を除去する。除去には硫酸と過酸化水素溶液の混合液や酸素プラズマによる方法が用いられる。次に、eのように、パターニングされた酸化膜19を用いてシリコンウエハー基板20のエッティングを行う。エッティング方法としては等方性、異方性のウエットエッティングやプラズマを用いたドライエッティングなど既存の様々な方法が適用可能である。次に、fのように、酸化膜19を除去する。この場合は単に除去するだけであるので、例えばフッ酸溶液を純水で50%に希釈した溶液に浸すことにより行なえばよい。次に、gのように、エッティングされた溝部分も含めシリコンウエハー基板20の周囲をシリコン酸化膜21で覆う。

【0032】以上で溝の物理的な加工は終了するが、さらに、hに示すように、光透過性の蓋23を接合すれば、で示したような個別出入口14a, 14b, 14c…および共通出入口15を設けたDNAキャピラリィの

アレイを形成することが出来る。aで示された基板16はhでは酸化膜21で覆われたシリコンウエハー基板20に相当する。なお、蓋23の接合は陽極接合法を用いることが出来る。陽極接合法とは500℃程度に加熱しながらシリコンウエハー基板20と蓋23に1000Vの電圧を印加して基板同士を接合する方法で、このために蓋23にはシリコンと熱膨張率のほぼ等しいパイレックス(登録商標)ガラス等を用いる必要がある。また、この方法では、必ずしも、蓋23を同様のシラン処理する必要はなく、この場合には、シリコンウエハー基板20の溝部分のみに光反応によるDNAプローブの固相化が行われて、U字状の固相領域が得られる。しかし、蓋23も同様のシラン処理を行うようにすれば、で示したのと同様に環状にDNAプローブを固相化されるので、固相効率および反応感度上有利である。

【0033】前記溝加工においてはシリコンウエハー基板20を用いたが、石英やパイレックスガラスなどのガラス基板を用いることもできる。その場合には基板のエッチングマスクを酸化膜19の代わりに金などの金属マスクを用いる。また、接合もそのまま陽極接合法を用いることは出来ないが、間にシリコン薄膜を形成することにより可能となる。シリコンウエハー基板20のエッチングマスクに用いた酸化膜19もこれに限定されることなく、窒化シリコン膜やアルミナ等の膜が利用できる。

【0034】このように形成されたDNAキャピラリーアレイには次のような作用効果がある。一度に大量のDNAキャピラリィが形成できるため、コストを低価格にすることが出来る。また、キャピラリィが形成する流路に対して紫外線照射による脱保護を行うので、DNAプローブをキャピラリィの内壁に効率良く固定化でき、試料の測定感度が向上する。また、多くの試料を測定する際にもDNAキャピラリィが集積化されているため、例えば、個別出入口14a, 14b, 14c…からそれぞれ異なる試料を導入して、所要時間インキュベーションして生物学的反応をさせた後に、共通出入口15から一括して試料を回収除去し、以後、適宜、洗浄液や測定用試薬を同様の流れで処理できるから、自動化し易くひいては測定処理能力の高い装置を構成することが出来る。

【0035】なお、本発明のDNAキャピラリィは、上述した実施の形態にとらわれることなく様々な変形が可能である。例えば、上述した各実施の形態では、その製造および試料測定に当って、いずれも互いに異なる開口部を用いて注入と排出を行っているので、各々の液体については必ず一方向の流れが存在するが、場合によっては注入時の開口部と同じ開口部から排液するようにして、注入時の流れとは反対方向に戻すようにしてもよい。また、第一の実施形態では、キャピラリィ4への固相化処理用液体および試料測定用液体の注入を、ピッパーのような吐出手段を利用するように説明したが、所要量の固相化処理用液体または試料測定用液体を各々収

容している容器に直接キャピラリィ4の先端(注入用開口部2a)を漬けるだけで毛管力で自然注入できるし、排液についても、特別な吸引装置を利用しなくとも高吸水性材料(スポンジ、高吸水性ポリマー等)に先端(排出用開口部2b)を接触させるだけで自然排液できるので、用手法・自動化ともに扱い易い。また、第一の実施形態のキャピラリィ4は、横に寝せた状態でも縦向きに立てて使用しても同様の作用効果が得られる。縦向きにする場合には、注入用開口部2a側を上側にした姿勢のまま、上方からの注入を行うとともに排出用開口部2bを通じて下方からの排液を行うようにもできる。

【0036】また、第二の実施形態では、各々のDNAキャピラリィ13a, 13b, 13c…の一端を連結流路17で連結しているが、各DNAキャピラリィ13a, 13b, 13c…を放射状に配置して一端部をいずれも中心付近で連結することで、各流路が合流する部分のみからなる合流路とし、他端部を同心円上に配置することも可能である。また、複数のDNAキャピラリィ13a, 13b, 13c…を連結流路17で連結せずに、各々独立した流路で構成するようにすれば、複数の試料を効率良く処理する集積化アレイを提供できる。

【0037】また、本発明のDNAキャピラリィは、試料測定以外にも、DNAまたはmRNAの分離・精製にも利用可能である。また、本発明のDNAキャピラリィに固相化する対象は、抗原抗体反応に関与するタンパクを構成するものであっても構わない。また、試料測定に当っては、本件出願前に公知であるDNAプローブを用いた任意の反応原理から適宜選択すればよい。このとき、測定に必要な種々の試薬、例えば蛍光、化学発光物質、発色物質等の標識試薬は公知の化学分析技術にしたがって利用してよい。必要ならば、選択した反応原理に適した市販の分析装置によって、自動測定することも可能である。

【0038】上述した実施形態に述べたように、本発明のDNAキャピラリィは、それ自体が液体を流す流路を形成しているため、上述した固相化、測定、分離等の各種反応や洗浄操作も容易に行え、液体処理装置のような種々の液体を連続的に処理するような装置に接続するだけで容易に一連の操作を行わせることが出来る。また、予め所望の塩基配列からなるDNAプローブを用いることにより、1回の光照射でDNAプローブを固相化できるため、DNAプローブへのダメージをきわめて少なくすることが出来、良好な固相化状態を保てるという利点がある。また、光反応を利用することで、複数のDNAプローブが流路に沿って直列して環状に且つ縞状に配置されているので、試料を流路中に導入するだけで複数のDNAプローブと同時に且つ効率良く結合反応させることができる。さらに、DNAプローブを固相化した表面はキャピラリィの内面に保護されるため、汚染の影響も

少なくより一層のハンドリングの容易さが期待できる。
【0039】図6に直列配置領域（13aから13c）としての流路に沿ってその配置領域に垂直になるように互いに独立して且つ縞状に配置されている複数の固相化領域（12aから12c）からなる固相化領域群22を具備する集積化反応装置の例を示す。

【0040】

【発明の効果】固相化領域毎に固相化された固相化対象を用いた測定を行う際に、必要な各処理用の流体、例えば試料や洗浄液のような各種液体の取り扱いが簡単である。

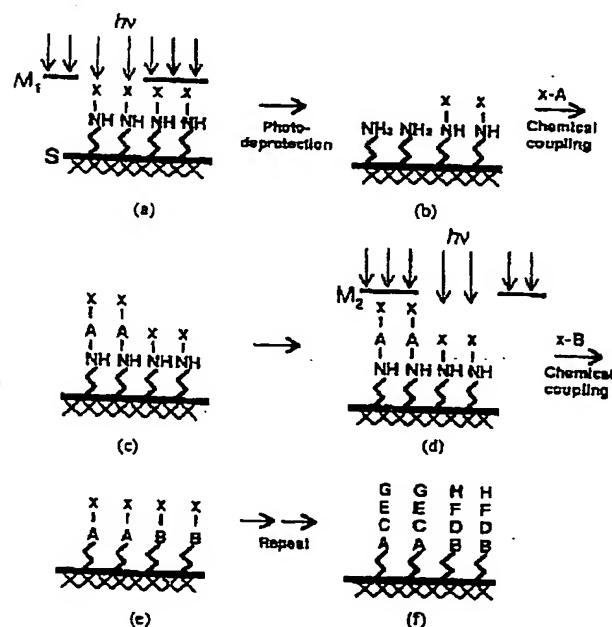
【0041】また、複数の固相化領域群に亘り、直列する複数の固相化領域に固相化される固相化対象について効率よく検出することが可能である。

【図面の簡単な説明】

【図1】従来のDNAプローブの固相化方法を説明するための図。

【図2】本発明のDNAキャピラリィの第一の実施の形態を示す図。

【図1】



【図3】DNAプローブをキャピラリィの内壁に固定化する方法を説明するための図。

【図4】本発明のDNAキャピラリィの第二の実施の形態を示す図。

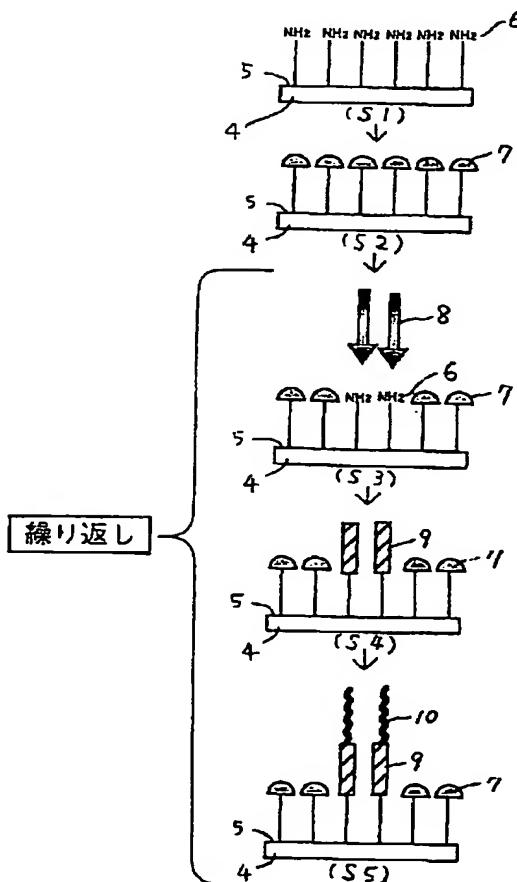
【図5】本発明のDNAキャピラリィにおいて半導体加工技術を用いて溝加工する方法を説明するための断面図。

【図6】本発明の反応装置の例を示す図。

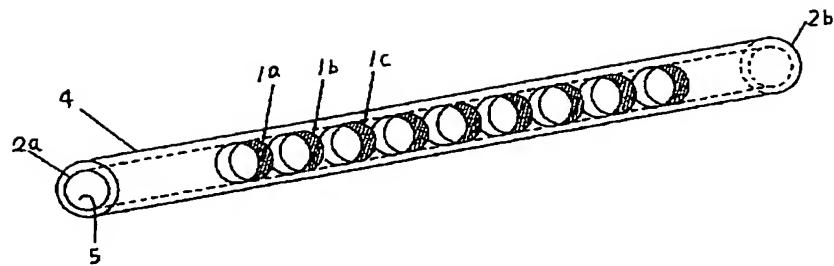
【符号の説明】

10 1 DNAプローブ
2 a 注入用開口部
2 b 排出用開口部
4 キャピラリィ
5 内壁
13 DNAキャピラリィ
14 個別出入口
15 共通出入口
16 基板
17 連結流路

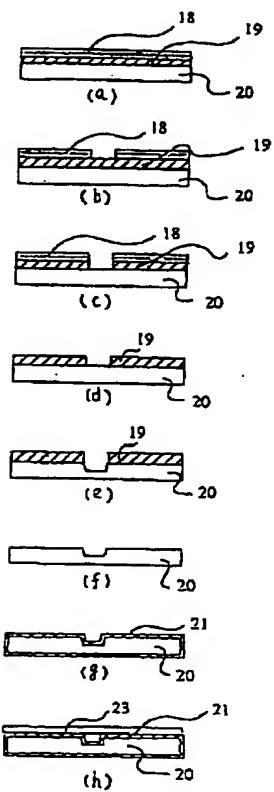
【図3】



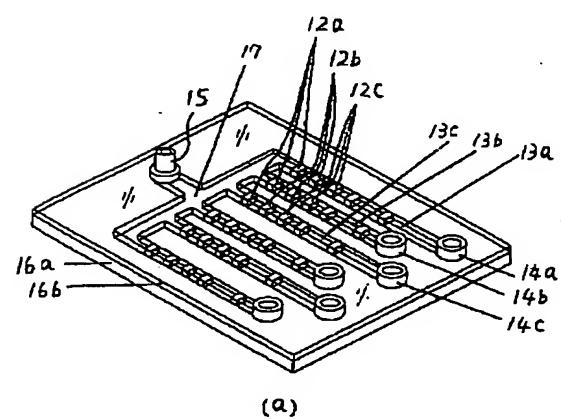
【図 2】



【図 5】



【図 4】



【図 6】

